

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Humán adipociták “browning”-folyamatát kiváltó szerek
azonosítása;**

Populációs-szintű sejtes vizsgálatok kialakítása

Kristóf Endre Károly

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT-ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2016

Humán adipociták “browning”-folyamatát kiváltó szerek azonosítása;

Populációs-szintű sejtes vizsgálatok kialakítása

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: dr. Kristóf Endre Károly általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bánhegyi Gábor, az MTA doktora

Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris
Biológiai Intézet diszkussziós terme, 2016. december 1. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Kovács Krisztina, az MTA doktora

Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bánhegyi Gábor, az MTA doktora

Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora

Dr. Kovács Krisztina, az MTA doktora

Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekgyógyászati
Intézet tanterme, 2016. december 1. 13 óra

1. BEVEZETÉS

1.1. Az emlősökre jellemző hőképző szerv: a barna zsírszövet

A barna zsírszövet létezését legelőször Konrad Gessner írta le a 16. században. Később rájöttek, hogy a barna zsírszövet minden emlős állatban megtalálható, azonban hőtermelő funkcióját csupán 400 évvel később azonosították. Termoneutrális állapotban élő rágcsálókban a barna zsírszövet főleg az interscapularis, subscapularis, hónalji és nyaki területekre lokalizálódik.

Mind a fehér, mind a barna zsírsejtek triglicerideket halmoznak fel citoplazmájukban. A fehér zsírsejtekben általában csak egy nagy lipidcsepp (30-100 μm) alakul ki *in vivo*. Ekörül található meg a vékony citoplazma réteg. Ezt a megjelenést az irodalomban gyakran unilokulárisnak jelölik. Ezzel ellentétben, a barna zsírsejtek számos, apróbb zsírcseppet halmoznak fel, ún. multilokuláris elrendeződésben. A barna zsírsejtek általában poligonális vagy ellipszoid alakúak és nagyobb mennyiségű mitokondriumban-gazdag citoplazmát tartalmaznak. A fehér és barna zsírsejtek mitokondriumainak elektronmikroszkóppal meghatározott morfológiai jellemzői is nagyban különböznek. Míg a fehér sejtek kicsi, hosszúkas mitokondriumokat tartalmaznak, a barnákban nagy, duzzadt, krisztákban-gazdag mitokondriumok alakulnak ki. A legtöbb esetben a barna és az azt körülvevő fehér zsírszövet anatómiai határa nem egyértelmű. Emellett fontos hangsúlyozni, hogy a zsírszöveteket alkotó összes sejt 20-50%-a zsírsejttől eltérő sejtek, melyek az ún. stromal-vascular fraction-t (SVF) alkotják. Ide tartoznak az ereket alkotó sejtek, zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek (ADMSC), egyéb előalakok, fibroblasztok, makrofágok (M Φ), limfociták, hízósejtek és idegrostok.

A barna zsírszövet különleges funkciójáért felelős mitokondriális fehérjét, az Ucp1-et (Uncoupling protein 1, vagy Termogenin) 1978-ban azonosították. Az Ucp1 fehérjét szétkapcsoló fehérjének is nevezik, működésének hatására proton visszaáramlás történik a mitokondrium mátrixába a terminális oxidáció és az oxidatív foszforiláció szétkapcsolódásával. Az ATP termelés így elmarad, viszont helyette hő keletkezik. Ezzel párhuzamosan a barna zsírsejtek mitokondriumai nagy mennyiségben tartalmazzák a respirációs lánc enzimeit. Ugyanakkor a F₁F₀-ATPáz nagyon alacsony mennyiségben fejeződik ki bennük, mivel a sejtmagban kódolt ATP5G1 gén (mely kódolja az F₀ oligomer mitokondriális membránhoz kapcsolt c alegységét) expressziója le-regulált. Az Ucp1-et hosszú láncú zsírsavak aktiválják, melyeket a hormon-szenzitív

lipáz enzim hasít ki a citoplazmában tárolt trigliceridekből. Ezt a folyamatot a β 3-adrenerg stimuláció váltja ki. A zsírsavak – melyek ideiglenesen kapcsolódnak az Ucp1-hez hidrofób interakciók révén - szállítják a protonokat az Ucp1 fehérjén át, keresztül a belső mitokondriális membránon. Ezután a protonok szabaddá válnak a mitokondrium mátrixban. A zsírsav-anion azonban továbbra is erősen kapcsolódik az Ucp1 fehérjéhez, így egy új proton transzlokációs ciklus kezdődhet. Ez a folyamat elsősorban a zsírsavak β -oxidációjából származó energiát hővé alakítja. A barna zsírszövet alapvető fontosságú a nem-didergéses hőtermelésben, mely azt jelenti, hogy a hőtermelés nem jár együtt a vázizomzat kontrakciójával, ugyanakkor biztosítja a hőháztartás egyensúlyát akár téli álmot alvó vagy újszülött állatokban. Az Ucp1-függő hőtermelés fontosságát számos kísérlet bizonyította. Például az UCP1-/- egerek képtelenek voltak fenntartani állandó testhőmérsékletüket, miután áthelyezték őket normál állatházi hőmérsékletéről (23°C) hideg környezetbe (5°C).

Először 1979-ben vetették fel azt a lehetőséget, hogy a barna zsírszövet hőtermelő képessége egy új célpont lehet metabolikus anomáliák, például elhízás kezelésére. Ekkor írták le az ún. étkezés- indukálta hőtermelési folyamatot, mely a felvett táplálékból származó felesleg energia egy részének elégetését jelenti. Ezt követően számos kísérlet bizonyította, hogy a barna zsírszövet mennyiségének, vagy aktivitásának fokozása egy soványabb, egészségesebb fenotípushoz vezet rágcsálókban. Az első kísérleteket, melyek a szimpatikus-idegrendszer (SIR) és a nem-didergéses hőtermelés kapcsolatát felvetették rágcsálókban az 1950-es években vitelezték ki. A hőtermelést végző elsődleges szövet felismerése jóval azután történt, hogy az azt szabályozó fő hormont, a noradrenalin (NA) azonosították. Majd bizonyították, hogy a szimpatikus idegrostokkal sűrűn átszőtt barna zsírszövetben a véráramlás is nagymértékben megnőtt, NA injekció hatására. Az aktiválódó β 3-adrenerg jelátviteli kaszkád adenilát-cikláz aktiválódásához vezet Gs fehérje hatására, majd 3',5'-ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) viszi tovább a termogénikus jelet. Ezért számos vizsgálatban PKA aktivátorokat (pl. forskolin) vagy sejt permeábilis cAMP analógokat (pl. dibutiril-cAMP) alkalmaznak a természetes hőképző jelek modellezésére. A NA az Ucp1 függő hőtermelés akut indukciója mellett még szabályozza a barna zsírszöveti sejtek differenciációját és proliferációját is.

1.2. Hőtermelő zsír depók: “klasszikus barna” és “beige” adipociták fejlődése

Mind a fehér, mind a barna zsírsejtek képesek trigliceridek tárolására és felszabadítására, kifejeznek jellemző adipocita marker géneket és egy sok szempontból hasonló differenciációs folyamat révén fejlődnek ki, melyet többek között a PPAR γ és a C/EBP transzkripciós faktor család tagjai szabályoznak. Emiatt a barna sejteket is adipocitáknak nevezték el, és sokáig úgy gondolták, hogy a két sejttípus egy közös előalakból származik. A barna zsírszövet fejlődésére irányuló kiterjedt vizsgálatok azonban rávilágítottak arra, hogy ezek a “klasszikus barna” zsírsejtek egy dermatomiotómális prekursorból erednek és fejlődéstanilag közelebb állnak a vázizom sejtekhez, mint a fehér adipocitákhoz. Különböző jelek hatására, mint például a bone morphogenetic protein 7 (BMP7), a dermatomiotómális prekursorok elköteleződnek és barna zsírsejt előalakokká differenciálódnak, melyeknek jellemző markere az early B cell factor-2 (EBF2).

A “klasszikus barna” adipocita differenciációt szabályozó transzkripciós kaszkádokat részletesen tanulmányozták rágcsálókban az elmúlt években. Az egyik meghatározó faktor, mely kijelöli a barna zsírsejt identitást, a PRDM16. Ez a fehérje transzkripciós ko-aktivátorként működik, közvetlen interakcióba lép számos kulcsfontosságú adipogénikus transzkripciós faktorra (PPAR α , PPAR γ , PGC-1 α , C/EBP β). A PRDM16 és FOXC2 hatására indul be a hideg-indukált, cAMP-függő hosszú távú termogénikus folyamat, mely során a barna zsírsejtek differenciálódnak és fokozódik a barna zsírszövet vaszkularizációja. E folyamat során emelkedik a PPAR γ Coactivator-1 α (PGC-1 α) kifejeződése. A PGC-1 α - egy transzkripciós ko-aktivátor, mely kapcsolatba lép az IRF4-gyel és a magreceptor PPAR γ -val – indukálja a mitokondriumok biogenezisét és meghatározó funkcióval bír a nem-didergéses hőtermelés beindításában. Több, mint 30 évvel ezelőtt “barna-szerű” zsírsejteket találtak elszórtan a rágcsálók fehér zsírszövetében. Ezek a sejtek a hideg által kiváltott SIR stimuláció hatására keletkeztek. Zsírcseppjeik multilokuláris elrendeződésűek voltak. Ezenfelül nagy mennyiségben tartalmaztak Ucp1-et kifejező mitokondriumokat. A jelenség – mely csökkentette az elhízás és az inzulin rezisztencia kialakulását - magyarázatoként a fehér zsírsejtek barna adipocitákká történő közvetlen transz-differenciációját vélték. Később, egereken és humán mintákon végzett kísérletek eredményei azt sugallták, hogy a “barna-szerű” zsírsejtek meghatározott előalakokból (melyekben nagymértékben kifejeződik a PDGFR α és az EBF2) differenciálódtak, különböző jelek (pl. hideg, fizikai aktivitás) hatására. A folyamat szabályozásában szintén fontos szerepet játszik a

β 3-adrenerg jelátvitel. A főként szubkután zsírszövetben differenciálódó, indukálható hőtermelésre képes zsírsejt populációt “beige” (vagy “brite”) adipocitaként nevezték el. Létrejöttük folyamatát az irodalom “browning”-ként jelöli.

A “beige” adipociták kialakulása erősen fokozódik számos neuro-endokrin illetve parakrin jel hatására. A differenciáció folyamata sok ponton közös a “klasszikus barna” fejlődési útvonallal. Az energiát felszabadító “beige” és az energiát tároló fehér zsírsejtek aránya, legalábbis részben, a mezenchimális előalak sejtek korai elköteleződési fázisban dől el. A folyamat szabályozásának egyik kulcslépését a közelmúltban tárták fel. Az FTO gén egyik intronjában egy mezenchimális “super-enhancer” régió található. Ha ehhez egy represszor fehérje kötődik, az IRX3 és IRX5 transzkripciós faktorok kifejeződése csökken, mely a progenitor sejtek “beige” előalakokká való elköteleződését segíti elő. Mindez fokozza a hőtermelő képességet és csökkenti a lipidek raktározását.

A “klasszikus barna” zsírsejtekkel ellentétben az érett, stimulálatlan “beige” adipociták alacsonyabb mértékben fejezik ki a hőtermeléshez szükséges géneket. Ha a termogenikus jel megszűnik, fehér-szerű “masked beige” adipociták maradnak vissza *in vivo*. Mind az érett, mind a “masked beige” zsírsejtek képesek jelentősen fokozni az UCP1 kifejeződését és a hőtermelő képességüket újra megjelenő termogenikus stimulus hatására. Elmondható, hogy a “beige” adipociták gyorsan képesek ki-bekapcsolni hőtermelő programjukat külső jelek hatására, a szervezet igényeinek megfelelően.

Bár a közelmúltban számos hasonlóságot és különbséget leírtak a “klasszikus barna” és “beige” adipociták összehasonlítása és megkülönböztetése érdekében, továbbra sincs egységes konszenzus a fent említett zsírsejt típusok osztályozására vonatkozóan. Különösen igaz ez humán minták esetében. A fehér adipocitákhoz képest a termogenikus gének (pl. UCP1, PGC-1 α , CIDEA, ELOVL3, PRDM16) és a mitokondriális markerek (pl. CYC1, COX2, COX5B, ATP5B) emelkedett kifejeződését figyelték meg mindkét hőtermelő zsírsejt típusban, különösen ha stimulálták azokat. Egerekben, a “klasszikus barna” zsírsejtekben emelkedett ZIC1, LHX8, MYL6F, PDK4, stb. génkifejeződést figyeltek meg a fehér vagy “beige” adipocitákhoz viszonyítva. Ezek közül csak a ZIC1-et és az LHX8-at sikerült validálni, mint “klasszikus barna” marker gént, humán mintákban. Fontos megjegyezni azonban, hogy az UCP1 konstitutív expressziója a legtöbb esetben magasabb “klasszikus barna” zsírsejtekben, a “beige” adipocitákhoz viszonyítva. A “beige” adipociták felismeréséhez egerekben a legelfogadottabb markerek a TBX1, TMEM26, HOXC9, CD137, CITED1

és TNFRSF9. Ez idáig széles-körben elfogadott sejtfelszíni markereket sem sikerült azonosítani a különböző zsírsejtek elkülönítésére. Ennek következtében a különböző típusú hőtermelő adipociták azonosítása és ki-szortolása kevert sejt-populációkból akadályokba ütközik. Ezenfelül, a “masked beige” és a fehér adipociták elkülönítésére sem ismerünk még specifikus molekuláris jellemzőket.

Egerekben, mind a „klasszikus barna” zsírszövetből, mind a “beige” depókból izolált mitokondriumok képesek voltak hatékony UCP1-függő hőtermelésre. Ezzel párhuzamosan az oxidatív foszforilációval képződő ATP mennyisége csökkent. A hőtermelő adipociták ezenfelül UCP1-független termogenikus mechanizmusokkal is rendelkeznek. A kreatin metabolizmusban fellelhető szubsztrát ciklust nemrég azonosították, mely hozzájárul a “beige” sejtek (kisebb mértékben a “klasszikus barna” adipociták) mitokondriumaiban az energia leadásához. A ciklusban a mitokondriális kreatin-kináz 1 és 2 katalizálja a kreatin átalakulását foszfo-kreatinná (PCr), ATP-függő módon. Ezt követően, a Phospho1 foszfataz felszabadítja a PCr magas-energiájú foszfát-csoportját. Az ilyen folyamatok relatív jelentősége a hőtermelésben, illetve a mögöttük álló szabályozó mechanizmusok azonban még feltáratlanok.

1.3. A “browning”, mint terápiás lehetőség

Az elhízás számos betegség rizikófaktora, mint pl. szívbetegségeknek, az inzulin rezisztenciának, a magas vérnyomásnak és a daganatok bizonyos típusainak, melyek az elhalálozás legfőbb okai lehetnek. Európában évente négy millióan halnak meg kardiovaszkuláris megbetegedés következményeként. Magyarországon a kardiovaszkuláris mortalitási ráta (640/10000 lakos) bár évek óta fokozatos javuló tendenciát mutat, még mindig közel kétszerese az EU-25 országok átlagértékének. Magyarországon a túlsúlyosak aránya a lakosság 57,7%-a, ide sorolva a 24,8% elhízottat is. A túlsúllyal/elhízással kapcsolatban felmerült közkiadások összege hazánkban, 2012-ben több mint 200 milliárd forint volt. A mitokondriális szétkapcsolás fokozásának ötlete, mint terápiás lehetőség, régóta felmerült. Korábban, 2,4-dinitro-fenolt adtak elhízottaknak, hogy növeljék a betegek hőtermelését. Később azonban súlyos mellékhatások miatt a 2,4-dinitro-fenol kezelést kivonták a forgalomból.

Bizonyított, hogy felnőttekben számos aktív barna és “beige” terület található, melyek hőtermelő képessége például hideg által fokozható. A termogenikusan aktív területekben intenzív a szénhidrát-anyagcsere, így ezen szövetekre jellemző a fokozott fluorodeoxiglükóz (^{18}F -FDG) felvétel, ami jól látható a PET/CT felvételeken. A

metabolikusan aktív területek apróbb szigetekben jelennek meg az egész szervezet fehér zsírszövet tömegében, de elsősorban a lapockák közötti térre, a mély nyaki és a paravertebrális régiókra lokalizálódnak. Humán vizsgálatok emellett rávilágítottak az elhízás és az aktív barna zsírszövet mennyiség közötti erős negatív korrelációra. A “klasszikus barna” és a “beige” zsírszövet aktivitása akár 5% -ban járulhat hozzá az alapanyagcseréhez emberekben, mely évente 4 kg zsír elégetését eredményezheti.

Habár felnőttekben is találtak olyan adipocitákat a mély nyaki régiókban, melyek “klasszikus barna” marker géneket fejeztek ki, a legtöbb adat arra utal, hogy emberekben a hőtermelésért felelős zsírsejtek többsége “beige” típusú. Ennek ellenére a humán “beige” differenciációs program részletei még a legtöbb ponton ismeretlenek számunkra.

A “browning” folyamata során érett, stimulálatlan, ezért kevésbé aktív “beige” sejtek jönnek létre. Az így differenciálódott sejtek száma meghatározza az egyének “beige” potenciálját, vagy hőtermelési képességét. Tehát a “beige” potenciált alapvetően a hőtermelő “beige” és a zsírokat raktározó fehér zsírsejtek aránya szabja meg minden személyben. Például, akik az FTO lókuszt egy gyakori rizikó-allélját hordozzák, elhízásra lesznek hajlamosak, mivel a bennük lévő adipocita előalakok kisebb mértékben tudnak a “beige” differenciáció irányába elköteleződni. Ez a friss tanulmány volt az első, melyben obezitásra hajlamosító genetikai faktorként egy, a “beige” zsírsejtek kialakulását nehezítő tényezőt írtak le. A hőtermelő képesség esetleg fokozható “browning”-ot indukáló mediátorok segítségével, vagy érett “masked” illetve aktivált “beige” adipociták transzplantációjával. A “browning” program végeztével, mind az érett, mind a “masked beige” zsírsejtek hőtermelése erőteljesen fokozható (UCP1-függő és független mechanizmusokkal) különböző zsírégető jelek – például adrenerg stimulus – hatására. Ezt nevezzük termogenikus aktivációnak. A legfontosabb természetes termogenikus jel, a hideg a SIR-en keresztül NA kibocsátást és következményes hőtermelést vált ki, zsírsavak és glükóz elégetése révén. Ismert, hogy a nem szelektív β -adrenerg agonisták veszélyes kardiovaszkuláris mellékhatásokat válthatnak ki. A β_3 -receptor mediált útvonal szelektív aktiválása (pl. mirabegronnal) azonban egy ígéretes terápiás lehetőségként kínálkozik fel a termogenezis fokozására.

Bizonyított, hogy a barna zsírszövet nemcsak hőt állíthat elő, hanem aktív endokrin szövetként is képes funkcionálni, és az általa kibocsátott faktorok képesek a teljes szervezet metabolikus profilját befolyásolni. Egerekben ismert, hogy a barna zsírszövet az IL-6 termelésével kedvezően befolyásolhatja a metabolikus státuszt azáltal, hogy az

inzulin érzékenységet fokozza. Ugyanakkor kevés adat áll rendelkezésünkre a humán barna és “beige” adipociták szekréciós tulajdonságairól.

1.4. „Browning” –ot kiváltó faktorok, a hőtermelés indukálása

Rágcsálókban régóta ismert tény, melyet a közelmúltban humán vizsgálatok is alátámasztottak, hogy a hideg környezet, illetve a fokozott fizikai aktivitás központilag aktiválja a SIR-t, ami ennek hatására NA-t bocsát ki, növelve a barnuló zsírsejtek számát a fehér zsírszövetben. A MΦ-ok esetleges alternatív úton történő aktiválódása is NA termelést válthat ki, mely fokozhatja a differenciálódó “beige” adipociták hőtermelő képességét. Rágcsálókban, az inzulint táplálkozással-összefüggő, központilag ható, akut hőtermelést indukáló hormonnak írták le korábban. Később bizonyították, hogy az inzulin jelátvitel stimulálja a GLUT4 transzporter fel-regulálását és kihelyeződését a plazma membránba nemcsak fehér, hanem barna zsírsejtekben is. E folyamatnak meghatározó jelentősége van a glükóz felvételében és a lipidcseppek tárolásában.

A leptin – zsírsejtek által szekretált, étvágycsökkentő hormon – a hipotalamuszban serkenti a melanocita-stimuláló hormon szintézisét, így aktiválva a SIR-t, mely indukálja a barna zsírszöveti termogenezist. A központi idegrendszerre (KIR) ható glükokortikoidok csökkentik a leptin-hatást *in vivo*. Azonban a primer egér barna zsírsejtek direkt dexametazon kezelése fokozza az ELOVL Fatty Acid Elongase 3 (ELOVL3) gén kifejeződését és a barna adipociták differenciációját. Korábban azt feltételezték, hogy a pajzsmirigy hormonok főleg perifériás hatásaik révén fokozzák a hőképzést. A közelmúltban azonban kimutatták, hogy a T3 gátolja az AMPK enzimet a ventromediális hipotalamuszban, mely a SIR aktivációjához és következményes hőtermelés indukcióhoz vezet.

Régóta ismert, hogy a szerotonin (5HT) KIR-i hatásai révén szabályozza az energiaháztartást, úgy hogy csökkenti az étvágyat és fokozza a barna zsírszövet hőtermelését. A fent említett hatásokat kiaknázva alkalmaztak étvágycsökkentő szereket (pl. fenfluramin, sibutarmin) az elhízás kezelésére. Azonban súlyos kardiovaszkuláris mellékhatások miatt ezeket a gyógyszereket később kivonták a forgalomból. A közelmúltban két független vizsgálat igazolta, hogy a perifériás 5HT-nak a centrálisétól eltérő hatása van. Egerekben a 5HT, közvetlenül a zsírsejtekre hatva csökkentette a “beige” potenciált és a termogenikus indukció mértékét. Az antipszichotikumokat a szkizofrénia és a bipoláris zavarok kezelésére fejlesztették ki. Idővel bebizonyosodott, hogy ezeknek a szereknek több káros mellékhatása lehet, például trombózis, elhízás,

diabetes, vérképzőrendszeri betegségek, epilepsziás rohamok. Az atípusos antipszichotikumokat (AAP) a rezisztens esetek eredményesebb kezelése és a mellékhatások csökkentése érdekében fejlesztették ki. Az AAP-k, például a clozapine számos 5HT, muszkarinos kolinerg és hisztamin receptorhoz képes kötődni és antagonizál adrenerg $\alpha 1$ és 2 illetve dopamin receptorokat.

A fizikai aktivitás számos előnyös metabolikus hatást vált ki. Védelmet nyújt emellett különböző kórállapotok, mint például a metabolikus szindróma, neurodegeneratív betegségek vagy daganatok ellen. A váz- és szívizomsejtek számos hormon kibocsátására képesek –ezeket miokineknek nevezzük – fizikai aktivitás hatására. Ezek a faktorok jelentősen hozzájárulnak az idegrendszer –izom –zsírszövet közötti kommunikációhoz, mely által a „browning” folyamata is nagymértékben szabályozott. Az irisint szintén a vázizomzat termeli, fizikai aktivitás és didergés hatására rágcsálókban, a PGC-1 α által vezérelve. Az FNDC5 transzmembrán prekursor fehérje hasításával keletkezik. Az irisin egy olyan miokin, amely képes a szubkután fehér zsírszövetben „browning” programot indukálni egér modell rendszerben. Ugyanakkor rágcsálókban a szívizomsejtek is nagymértékű irisin kibocsátásra képesek. Az irisin valószínűleg egy ismeretlen sejtfelszíni receptoron keresztül hat a p38 MAPK és ERK útvonalakat aktiválva. Az FNDC5-öt kódoló gén ATG start kodonja azonban hordoz egy G→A mutációt a humán genomban. Ez a változás egy rövidebb FNDC5 fehérjét eredményezne, melyből hiányzik az irisint kódoló szakasz. Ennek ellenére több tanulmány, antitestek és tömegspektrometria alkalmazásával kimutatta az irisin jelenlétét humán vérplazmában, mely korrelációt mutatott a fizikai aktivitással illetve különböző metabolikus paraméterekkel. Megjegyzendő, hogy a rágcsálókban mérhető irisin plazmakoncentráció (>100 ng/ μ l) legalább tízszerese a humán plazmában található irisin koncentrációknál (<10 ng/ μ l). Emellett az FNDC5 számos agyi területekben kifejeződik, illetve az irisin centrális hatása is felmerült.

Az IL-6-ot klasszikus pro-inflammatorikus citokinként ismerjük, melyet a vázizom, valamint a fehér és barna zsírszövet is szekretálhat. Elhízott emberekben például jellemző az emelkedett IL-6 plazma szint. Az IL-6 ugyanakkor segít elnyomni a súlygyarapodást és a kövérséget, az étvágy szabályozásától függetlenül. Az IL-6, mint citokin fizikai tevékenység hatására termelődik a vázizom által, mely az inzulin szenzitivitásra is pozitív hatással van. Képes emellett a M Φ -ok alternatív irányú aktiválódását elősegíteni.

Az átriális nátriuretikus peptid is egy meghatározó endokrin faktor, mely fokozza a termogenikus aktivációt és a mitokondriális biogenezist egerekben és humán adipocitákban. Szívizomsejtek termelik és a p38 MAPK útvonalat aktiválja a zsírsejtekben, mely az ATF2 foszforilációjához vezet. A p38 MAPK jelátvitel ugyancsak indukálódik egyes BMP-k hatására, melyek meghatározó endokrin-parakrin faktorok a hőtermelő képesség és aktiváció szabályozásában. Legrégebben a BMP7-et azonosították, mint egy lokálisan ható mediátort, mely mind a “klasszikus barna”, mind a “beige” adipociták differenciációját képes volt fokozni. Hasonló hatásokat írtak le később a BMP8b és a BMP4 esetében is.

A Fibroblast growth factor 21-et (FGF21) hepatociták és “beige” zsírsejtek is szekretálják. A citokin egy membrán receptor komplexhez kapcsolódik, melyben a β Klotho fehérje az 1c és a 4-es FGF receptorokkal kapcsolódik össze. Ligand bekötődése esetén az FRS2 α dokkoló fehérje, majd az ERK1/2 foszforilálódik, mely fokozza az inzulin szenzitivitást és beindítja a “browning” programot. Az FGF21 együttes hatása a májra és a zsírszövetre végül csökkent vércukor szinthez és fokozott energia felszabaduláshoz vezet. Ennek következtében az FGF21 analógjai klinikai tesztelés alatt állnak az elhízás és a diabétesz kezelésében.

Az adipocitákból, vagy a SIR-ből származó ATP lebomlásából keletkezhet adenzin, mely lokálisan hatva, ADORA2A receptorokon keresztül emeli a barna vagy “beige” zsírsejtek cAMP szintjét és a PGC-1 α -függő jelátvitelt. Ez bizonyítottan fokozza a termogenezist és a lipolízist egér és humán zsírsejtekben. Elmondható, hogy egyre több adat áll rendelkezésünkre olyan anyagokról, melyek a KIR-re nem fejtenek ki hatást, de hozzájárulnak a “browning” folyamatának szabályozáshoz. Ezen mediátorok közül jó néhányat maguk a differenciálódó barna vagy “beige” adipociták bocsájtanak ki a környezetükbe. A perifériásan ható szereket alkalmazva talán könnyebbé válhat a barna és “beige” zsírsejtek specifikus aktiválása vagy aktív barna zsírszövet tervezése *in vitro*, súlyos mellékhatások nélkül. Ezen módszerek a jövőben hatékonyabbá tehetik az elhízás és a diabétesz kezelését is. Ugyanakkor a “browning”-ot szabályozó faktorok hatásait a legtöbb esetben csak rágszálókon vizsgálták. Éppen ezért célul tűztük ki a humán barna és “beige” sejtek automatizált, precíz morfológiai vizsgálatát, mely választ adhat arra a kérdésre is, hogy a sejtek milyen arányban léptek a barna zsírsejt differenciáció irányába, különböző jelek hatására.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- *Ex vivo* humán barna és “beige” adipocita differenciáció sejtszintű, automatizált kvantifikálása lézer-pásztázó citometria (LSC) alkalmazásával.
- A “browning” differenciálódást indukáló, a közelmúltban egerekben azonosított irisin és BMP7 hormonok direkt hatásának vizsgálata *ex vivo* differenciáltatott, primer humán fehér adipocitákban.
- Génexpressziós és funkcionális vizsgálatokat az LSC alkalmazásával kiegészítve, eddig ismeretlen, a “browning”-folyamatot befolyásoló gyógyszer-hatások azonosítása.
- A clozapine váratlan “browning” hatása mögött álló molekuláris mechanizmus feltérképezése.
- A barna és “beige” zsírszöveti differenciáció hatásának vizsgálata a citokinek (“batokinek”) szekréciójára, *ex vivo* differenciáltatott humán adipocitákban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Etikai engedélyek

Lágyék (inguinalis) illetve hasfali (parabdominális) hasfali sérv műtétekből nyert szubkután zsírszövet mintákból (a betegek tájékoztatását követően, tájékozott beleegyezésüket aláírásukkal bizonyítva) zsírszövet eredetű mezenchimális őssejteket (ADMSC) izoláltunk. Az elektív sebészeti beavatkozáson átesettek kora 20-60 év között volt, testtömeg indexük kisebb volt, mint 29,9 és mentesek voltak egyéb társbetegségektől. Minden humán sejt izolációs kísérleti protokollt eleget tett a Helsinki Deklarációban foglalt irányelveknek. A kutatási tervet, a szövetminták gyűjtését megelőzően a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága jóváhagyta. (No. 3186-2010/DEOEC RKEB/IKEB).

3.2. Humán ADMSC-k izolálása és tenyésztése

Az ADMSC izolálás során az esetleges kötőszöveti területektől szikével élesen leválasztottuk a zsírszövetet, melyből apró darabokat preparáltunk. 120 U/ml kollagenáz (Sigma-Aldrich) kezeléssel, steril PBS-ben emésztettük a kötőszövetet 1 órán keresztül 37°C-on, közben rázogattuk a mintát. A sejteket növekedési tápfolyadékban: DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) + 10% FBS (Gibco) + 33 µM biotin (Sigma-Aldrich) + 17 µM pantoténsav (Sigma-Aldrich) + 1% penicillin/sztreptomycin (Sigma-Aldrich) szuszpendáltuk és 6 lyukú sejtenyésztő vagy Ibidi 8-lyukú µ-slides plate-re szélesztettük 37 °C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett, 15000 sejt/cm² sűrűségben. A Mycoplasma kontaminációt minden esetben PCR alapú analízissel kizártuk (PromoKine).

3.3. *Ex vivo* fehér és “beige” adipocita differenciáltatás

Fehér zsírsejt differenciáció során négy napig a következő médiumban tenyésztettük a sejteket: DMEM-F12 + 33 µM biotin + 17 µM pantoténsav + 10 µg/ml apo-transzferrin (Sigma-Aldrich) + 20 nM inzulin (Sigma-Aldrich) + 100 nM kortizol (Sigma-Aldrich) + 200 pM T3 (Sigma-Aldrich) + 2 µM roziglitazon (Cayman Chemicals) + 25 nM dexametazon (Sigma-Aldrich) + 500 µM IBMX (Sigma-Aldrich). A negyedik napot követően a roziglitazont, dexametazont és IBMX-et elhagytuk a fehér zsírsejt differenciációs tápfolyadékból. “Beige” zsírsejt differenciáltatás során az alábbi médiumban tenyésztettük a sejteket: DMEM-F12 + 33 µM biotin + 17 µM pantoténsav

+ 10 µg/ml apo-transzferrin + 0,85 µM inzulin + 200 pM T3 + 1 µM dexametazon + 500 µM IBMX. A harmadik napot követően a IBMX-et és a dexametazont és elhagytuk, majd 500 nM roziglitazont adtunk a barna adipocita differenciációs tápfolyadékhoz. A differenciáció alatt a sejteket 37⁰C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett inkubáltuk és minden második nap médiumot cseréltünk.

3.4. hADMSC-k és differenciált fehér és “beige” adipociták kezelése “browning”-indukáló és aktiváló szerekkel

A teljes differenciáció alatt, vagy a differenciáció utolsó négy napján a sejteket minden nap 250 ng/ml humán rekombináns irisinnel (Cayman Chemicals) illetve 50 ng/ml BMP7-tel (R&D Systems) kezeltük. A clozapine-t (Sigma-Aldrich) minden nap, 100 ng/ml-es koncentrációban a teljes differenciáció során, illetve a differenciáció utolsó 2 vagy 4 napján adtuk a sejtekhez. A differenciálódó sejteket minden nap 5HT-vel (Sigma-Aldrich) kezeltük, 10 µM-os koncentrációban. A termogenikus indukcióra adott válasz vizsgálatára, a sejtek 4 órán át 500 µM dibutiril-cAMP (Sigma-Aldrich) kezelésben részesültek.

3.5. RNS izolálás és valós idejű kvantitatív polimeráz lácreakció (RT-qPCR)

A sejtek lizálása TRI Reagent-tel (Invitrogen Life Technologies), az RNS kicsapása kloroformos extrakciót követően izopropanollal történt. A nukleáz mentes vízben feloldott RNS-t cDNS-sé a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) által meghatározott összetevőkből elkészített Master Mix segítségével írtuk át. A primerek és próbák az Applied Biosystemstől származtak. A RT-qPCR ABI Prism 7700 és Roche LightCycler® 480 készüléken történt. A relatív expressziót a 2- Δ C_tvizsgált gén/2- Δ C_tháztartási gén képlet alkalmazásával számítottuk ki, ahol a háztartási gén a GAPDH volt.

3.6. Mitokondriális (mt) DNS mennyiségének meghatározása Q-PCR-rel

Teljes celluláris DNS-t a hagyományos fenol-kloroform módszer alapján izoláltunk a zsírsejtekből, TRI Reagent használatával. Kvantitatív PCR során hígított DNS triplikátumokat használunk, 10µM-t mindegyik primerből (humán mtDNS specifikus primerek: forward 5'-CTATGTCGCAGTATCTGTCTTTG-3', reverz 5'-GTTATGATGTCTGTGTGGAAG-3'; és sejtmag specifikus (Sirt1 gén) primerek: forward 5'- CTTTGTGTGCTATAGATGATATGGTAAATTG-3', reverz 5'-

GATTAAACAGTGTACAAAAGTAG-3'), és Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix-et (Thermo Scientific). LightCycler 480 (Roche Diagnostics) készüléken az alábbi programot alkalmaztuk: 95°C 20 perc, majd ezt követően 50-szer ismétlődik a következő ciklus 95°C – 15 s, 58°C - 20 s, 72°C 20 s. Az eredményeket a küszöbérték ciklus különbségekből számoltuk ki, a mitokondriális DNS-re és a sejtmag specifikus amplifikációra.

3.7. Western-blot

A hADMSC-k és adipociták összegyűjtését és PBS-ben való mosását követően 50mM Tris-HCl; 0.1% Triton X-100; 1mM EDTA; 15mM 2-MEA és proteínáz gátlók jelenlétében lizáltuk őket, majd az oldhatatlan sejtörmelékét centrifugálással eltávolítottuk. A sejt-lizátumot 5% Laemmli loading pufferrel kevertük össze, melyet 10 perc forralás követett. A fehérjéket 10% SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd PVDF membránra blottoltuk, melyet 5% tejporral blokkoltunk. A membránokat egér monoklonális anti-GAPDH (Merck-Millipore) és poliklonális anti-Ucp1 (Sigma-Aldrich) elsődleges antitesttel kezeltük, 4 °C-on, egy éjszakán keresztül. Ezt inkubáltuk szobahőmérsékleten, egy órán át torma-peroxidáz (HRP)-konjugált anti-egér/nyúl (Covalab) antitesttel. Az előhívás Immobilon Western kemilumineszcens szubsztrát (Millipore) segítségével történt.

3.8. A differenciált adipociták élő- és immunfestése

A hADMSC-ket Ibidi 8-lyukú μ -slide-ra helyeztük ki és az előzőekben leírtak szerint differenciáltattuk. Ezt követően PBS-sel mostuk a sejteket, 750 μ g/ml Nile Blue-t (Sigma-Aldrich) és 50 μ g/ml Hoechst 33342-öt (Thermo Fisher Scientific) adtunk hozzájuk, 60 percre. Az élő-szkennelést követően 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk őket. Elsődleges anti-Ucp1 vagy anti-Cidea (Covalab) antitestet adtunk hozzájuk, melyet 6 órán keresztül szobahőmérsékleten tartottunk. Másodlagos antitestként Alexa 488-cal jelölt kecske anti-nyúl IgG-t használtunk (Thermo Fisher Scientific). Az antitestek hozzáadása előtt és után is mosási lépéseket végeztünk (0,1%-os szaponin, PBS-ben, mellyel a sejtek permeabilizálása is megtörtént).

3.9. Lézer-pásztázó citometriás (LSC) képalkotás, a sejtek felismerése

A sejtekről képek készítése iCys Research Imaging Cytometer (iCys Thorlabs Imaging Systems) segítségével történt. Az optimális konfluenciájú területet alacsony felbontású,

10-szeres nagyítású objektívvel szkenneltünk (NA 0.30), 10 μm -es szkennelési lépéssel. A magas felbontású képeket 40-szeres nagyítással (NA 0.75) és 0,25 μm -es szkennelési lépéssel kaptunk. A pixel méretét 0,25 μm x 0,245 μm x 40-szeres nagyításra állítottuk. A Lézer fényeket szétválasztottuk az alábbi módon: Viola dióda lézer 405 nm-en gerjesztette a Hoechst 33342-t, 488 nm-en argon-ion lézer segítségével az Alexa 488-at detektáltuk, míg a Nile Blue 633 nm-en He-Ne gázlézer által gerjesztődött. Az emittált fényt a különböző festékek esetében az alábbi sávszűrőkkel detektáltuk: Hoechst 450 ± 20 nm, Alexa 488 530 ± 15 nm és Nile Blue 650 ± 15 nm. A dióda fotodetektorokkal mért áteső lézer fényből meghatároztuk a fényvesztéseget és az árnyékolt kontúr jelet, hogy a fényabszorpció, a fényszórás és a “texture” értékeiről információt nyerjünk. A képeket az alábbi automatikus sejtfelismerő szoftverek segítségével processzáltuk és elemeztük: iCys companion software (iNovator Application Development Toolkit, CompuCyte Corporation) és CellProfiler (The Broad Institute of MIT). A Hoechst-magfestés alapján először a sejtmagokat azonosítottuk. A magok körül, mint másodlagos objektumokat, a teljes sejteket jelöltük ki, a Nile Blue fluoreszcencia alapján.

3.10. „Texture” analízis, egyedi sejtek Ucp1 és Cidea tartalmának kvantifikációja, a humán adipocita “browning” sejtpopulációs szintű elemzése

Mintánként 2-3 ezer sejtet gyűjtöttünk képanalízis céljából. Az összecsapzódott, a felszíntől felvált, elhalt sejteket kizártuk a kiértékelésből, így 1-2 ezer sejtet analizáltunk mintánként. Minden objektum esetében, a fényabszorpció texturális megjelenését és a fényszórás jeleket a CellProfiler beépített moduljaival analizáltuk. A “texture variance” érték egy központi pixel és a szomszédos területek közötti intenzitás különbségeket határozza meg; a “sum variance” összérték egy-egy sejtben a lipidcseppek méretéről ad felvilágosítást. Emellett meghatároztuk az alábbi paramétereket: terület, mely a sejthatárokon belüli pixelek darabszáma (így kiszámolható az egyes sejtek területe mikrométerekben); illetve integrál, mely a sejthatárokon belüli pixelek fluoreszcencia intenzitásának (jelölt fehérre kifejeződésével arányos) összege. Így a sejtenkénti Ucp1 vagy Cidea fehérje tartalom meghatározható, mint az integrál és a terület hányadosa az egyes sejtes objektumokra vonatkoztatva. Ezt követően az Ucp1 és Cidea intenzitásokat, illetve a “texture sum variance” értékeket minden egyes sejtre két-dimenziósan megjelenítettük. A barna vagy “beige” adipocitákat úgy ismertük fel, hogy ezek a sejtek kis lipidcseppeket tartalmaztak (“texture sum variance” értékük alacsony

volt) míg nagymértékben fejezték ki az Ucp1 és Cidea fehérjéket. Ezzel ellentétben a fehér zsírsejtek nagy lipidcseppeket akkumuláltak ("texture sum variance" értékük magas volt), azonban kevés Ucp1-et vagy Cidea-t tartalmaztak.

3.11. Az adipociták oxigén fogyasztásának meghatározása

A sejtek oxigénfogyasztását XF96 oximéter (Seahorse Biosciences) alkalmazásával vizsgáltuk. A sejteket 96-lyukú XF96 assay plate-ken tenyésztettük és differenciáltattuk. A mérés során meghatároztuk a differenciált sejtek alapszintű oxigén fogyasztását 30 percen keresztül, majd a sejteket dibutiril-cAMP egyszeri adásával (500 μ M koncentrációban) stimuláltuk, az adrenerg hatást modellezendő. Majd, a forszírozott oxigén fogyasztást 30 percenként detektáltuk. A zsírsejteket ezután 5 μ M etomoxir-ral (Sigma-Aldrich) vagy 2 mM β -GPA-val (Sigma-Aldrich) kezeltük, a β -oxidáció és a kreatin szubsztrát ciklus gátlása céljából. Ezt követően, a proton csorgásos légzést mértük, miután oligomycin-t (Enzo Life Sciences) 2 μ M koncentrációban adtunk a sejtekhez, így blokkolva az ATP-szintáz aktivitását. Végül a sejtek egy adag Antimycin A (10 μ M koncentrációban) (Sigma-Aldrich) kezelésben részesültek, mely után a mérés zajsztintje volt meghatározható. Az oxigén fogyasztási rátát (OCR) az egyes lyukakban megtalálható fehérje mennyiségekre normalizáltuk.

3.12. A differenciálódás alatt szekretált citokinek mennyiségének meghatározása

A differenciáltatási médium cseréje során az adipociták felülúszóit begyűjtöttük és pooloztuk. A zsírsejtek differenciációja alatt (fehér és "beige" differenciáció \pm irisin és BMP7 kezelés), a tápfolyadékba kibocsájtott TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 és MCP-1 mennyiségét ELISA DuoSet Kit (R&D Systems) alkalmazásával határoztuk meg.

3.13. Az eredmények statisztikai értékelése

Minden mérést 3-10 alkalommal, független egészséges donorokból származó SVF-eket alkalmazva ismételtünk meg. Az eredményeket átlag \pm SD formában fejeztük ki, a biológiai párhuzamosok számát minden esetben megjelöltük. Több csoport együttes statisztikai összehasonlításához egy szempontos variancia analízist (one-way ANOVA) alkalmaztunk, melyet Tukey post-hoc teszt követett. Két csoportot párosított, két-szélű Student-féle t-teszttel hasonlítottunk össze.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A “beige” programra jellemző génexpressziós választ indukál a korábban barnaként leírt adipocita differenciációs protokoll

Először hADMSC-ket izoláltunk, a szubkután zsírszövetből preparált SVF-ekből. A prekursor sejtekből fehér és barna zsírsejteket kívántunk differenciáltatni, korábban kialakított fehér és barna adipogenikus protokollok alkalmazásával. A zsírsejtek, valamint a preadipociták génexpressziós profilját RT-qPCR segítségével elemeztük. Általános barna zsírszövet marker (UCP1, ELOVL3, CIDEA, PGC-1 α), mitokondriális szaporulatot jelző (CYC1), barna zsírsejt programot meghatározó transzkripció faktor (PRDM16, C/EBP β), „klasszikus barna zsírszöveti” differenciációs marker (ZIC1), „beige”- szelektív marker (TBX1), fehér zsírszövet marker (LEP, C/EBP α) és általános zsírszöveti marker (FABP4, PPAR γ) génekre végeztünk expressziós vizsgálatot. Az UCP1 gén nem fejeződött ki a differenciálatlan hADMSC-kben és alacsony szinten expresszálódott a fehér differenciációs koktéllal indukált adipocitákban. Szignifikánsan magasabb UCP1 kifejeződést mértünk teljes sejt lizátumokban –mind mRNS, mind fehérje szinten – a barna differenciációs protokoll hatására, a fehérhez viszonyítva. A mitokondriális DNS mennyisége is magasabb volt a barna adipocitákban.

Az emelkedett UCP1 génkifejeződéssel párhuzamosan, egyéb “browning” marker gének (CIDEA, ELOVL3, CYC1 és PGC-1 α) fel-regulálódását is megfigyeltük a barna differenciációs koktél hatására. A ZIC1 gén kifejeződése ugyanakkor alacsony maradt a két hetes barna differenciáció alatt, mely kizárta a “klasszikus barna” program indukálódását. Ezzel ellentétben a “beige”-szelektív TBX1 kifejeződése szignifikánsan emelkedett, mely azt sugallja, hogy az Elabd és mtsai által kifejlesztett differenciációs protokoll a “beige” programot indukálja humán hasfali szubkután zsírsejt előalakokban. Az így differenciáltatott sejteket ezt követően “beige”-nek nevezzük a dolgozatban.

4.2. A humán adipocita “browning” kvantifikálható lézer-pásztázó citometria (LSC) alkalmazásával

Ez idáig a fehér, “klasszikus barna” és “beige” differenciációt főleg teljes sejt lizátumokból végzett gén- és fehérje expressziós mérésekkel vizsgálták humán sejt mintákból. Ugyanakkor, ilyen modellek alkalmazásakor akár a prekursor sejtek fele nem differenciálódik. Más vizsgálatokhoz hasonlóan, a hADMSC-k 40-60%-a, donorfüggő módon, akumulált zsírcseppeket egy két hetes adipogenikus

differentiációs periódus alatt. Mivel mind a fehér, mind a “beige” adipocita differentiációs programnak kitett sejtek populációja kevertnek bizonyult, úgy döntöttünk, hogy a “browning” programot egy, a letapadó sejtek vizsgálatára alkalmas képalkotó citometriás módszerrel kvantifikáljuk.

A “beige” differenciáció eredményeként szignifikánsan alacsonyabb “texture sum variance” értékeket figyeltünk meg, mivel az adipociták több apró lipidcseppet halmoztak fel. Az immunofluoreszcens jelek alapján azt találtuk, hogy az Ucp1 főleg a lipidcseppek között, míg a Cidea elsősorban a mag körüli citoplazmában volt fellelhető. Miután, mintánként 1-2 ezer sejtet ábrázoló képet analizáltunk, azt találtuk, hogy az egyes sejtek kétszer annyi Ucp1 és Cidea fehérjét tartalmaztak, amikor a “beige” differenciációs programon mentek keresztül.

Ezután, ábrázoltuk minden egyes differenciált zsírsejt Ucp1 vagy Cidea tartalmát illetve “texture sum variance” értékét (a nem differenciálódott progenitorokat kizártuk az analízisből). Barna és “beige” sejteknek azokat tekintettük, amelyek kis lipidcseppeket, viszont nagy mennyiségű Ucp1/Cidea fehérjét tartalmaztak. Ezzel ellentétesen, a fehér adipociták nagy zsírcseppeket és kevés „browning” marker fehérjét halmoztak fel. Eredményeink azt mutatják, hogy valójában a differenciálódó zsírsejtek egy heterogén populációt képeznek, a differenciáció típusától függetlenül. Még a fehér koktél alkalmazásakor is a sejtek jelentős aránya (a zsírsejtek 15-30%-a) “browning” jellemzőket vett fel. A “beige” protokoll alkalmazásakor az ilyen morfológiájú sejtek száma azonban megháromszorozódott.

4.3. Az irisin és a BMP7 a humán zsírsejtek “browning” programját indukálja

Az irisin és a BMP7 hormonok erős “browning” programot váltottak ki egerekben. A következő célunk az volt, hogy vizsgáljuk e molekulák hatását az előbb említett humán *ex vivo* rendszerben. Az LSC alkalmazásával megállapítottuk, hogy irisin és BMP7 jelenlétében differenciált fehér adipociták kisebb lipidcseppeket halmoztak fel és Ucp1 illetve Cidea fehérje tartalmuk nagyobb volt. Három donorból származó minta Ucp1 immunofluoreszcens intenzitás és texture “sum variance” értékei alapján elmondhatjuk, hogy a differenciált zsírsejtek 30-60%-a vette fel a “browning”-ra jellemző morfológiai tulajdonságokat, irisin és BMP7 kezelés hatására. Elmondható, hogy a képalkotó citometriás eljárással sikerült az irisin és a BMP7 “browning”-ot indukáló hatására vonatkozó, korábban egerekben leírt adatokat megerősíteni egy primer humán sejtes rendszerben.

4.4 A clozapine fokozza a humán zsírsejtek “browning” programját

Ezt követően, a fent említett képalkotó citometriás módszert kívántuk alkalmazni a különböző exogén anyagok humán “browning”-ra kifejtett – eddig nem ismert - hatásainak vizsgálatára. Csak néhány vizsgálat célozta eddig az AAP-k közvetlen hatásait a humán adipociták differenciációjára. Sárvári és mtsai. emelkedett génkifejeződést figyeltek meg a zsírszöveti markerek és a pro-inflammatorikus gének esetében, AAP kezelt differenciált humán zsírsejtekben. Ezt a tanulmányt alapul véve vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a clozapine kezelés a hADMSC-k képességét a “browning” folyamat véghezvitelére. Meglepetésre azt találtuk, hogy a clozapine kezelés a fehér koktél alkalmazása alatt kisebb lipidcseppeket tartalmazó adipocitákat eredményezett. Továbbá, magasabb Ucp1 fehérje mennyiségeket találtunk a clozapine jelenlétében differenciáltatott zsírsejtekben. A korábbiak alkalmazásával, azt mutattuk ki, hogy a differenciálódó adipociták 30-40%-a rendelkezett a “browning”-ra jellemző morfológiai jegyekkel, clozapine kezelés következtében. A “browning” zsírsejtek aránya így kb. másfél-szerese volt a kontroll fehér mintákhoz hasonlítva.

4.5. Az irisin és a BMP7 kezelés adipocita differenciáció alatt különböző génexpressziós mintázatot vált ki

Ezután, irisin és BMP7 kezelést végeztünk a fehér protokoll utolsó 4 napján, vagy a teljes fehér és “beige” differenciáció alatt. Két hét után begyűjtöttük a teljes sejtlizátumokat és a fent említett marker gének kifejeződését RT-qPCR-rel határoztuk meg. Megfigyeltük, hogy mind az irisin, mind a BMP7 alkalmazása a fehér differenciációs protokoll alatt fokozta az UCP1 és CIDEA mellett az ELOVL3, CYC1 és PGC-1 α gének kifejeződését.

A fokozott ZIC1 génexpresszió mellett, a C/EBP β , PRDM16, C/EBP α és PPAR γ emelkedett kifejeződését figyelték meg, hosszú távú BMP7 kezelés hatására. A TBX1 „bézs” marker gén kifejeződését ugyanakkor csak az irisin kezelés fokozta szignifikánsan. Eredményeink azt sugallják, hogy az irisin kezelés egy “beige” jellegű, míg a BMP7 adagolás egy “klasszikus barna”-szerű génexpressziós mintázatot indukál differenciálódó humán adipocitákban.

4.6. A clozapine fokozza a humán adipociták “beige” potenciálját az 5HT receptor mediált jelátvitel gátlása révén

Ezt követően vizsgáltuk a clozapine kezelés hatására beindult “browning” program mögött álló génexpressziós változásokat. A clozapine-t a terápiás vérplazma-szintnek megfelelő koncentrációban, a teljes fehér differenciáció során, illetve a differenciáció utolsó 2 vagy 4 napján adjuk a sejtekhez. Az UCP1-gén kifejeződése ötszörösére fokozódott a clozapine jelenlétében. Ezzel párhuzamosan a clozapine kezelés az ELOVL3, CIDEA, CYC1, PGC1A és TBX1 gének fokozott kifejeződését eredményezte az *ex vivo* differenciáltatott humán adipocitákban. Ezenfelül, a β -oxidációhoz kapcsolódó mitokondriális lokalizációjú gének kifejeződése is fokozódott kismértékben clozapine adagolás hatására. A ZIC1 gén expressziója ugyanakkor alacsony maradt, mely kizárta a “klasszikus barna” fejlődési program indukálódását. Összegezve elmondható, hogy clozapine jelenlétében a humán adipociták differenciációja nagyobb mértékben a “beige” irányba tolódik el.

Majd megvizsgáltuk, hogyan változik a fő termogenikus fehérje, az Ucp1 szintje. Ekkor, az *ex vivo* differenciáltatott humán fehér zsírsejtek clozapine kezelése eredményeként az Ucp1 fehérje kifejeződésének fokozatos emelkedését tapasztaltuk a kezelés időtartamának előrehaladtával a teljes sejtltizátumban.

Ismert, hogy a clozapine számos 5HT receptort képes gátolni. Hogy megértsük a clozapine “browning”-ot kiváltó hatásának mechanizmusát, először megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy a szer nem-e ezen receptorok antagonizálásával indukálja-e a “beige programot. Az 5HT szintézis sebesség-meghatározó lépését a triptofán-hidroxiláz 1 (TPH1) katalizálja. Azt találtuk, hogy ez az enzim kifejeződik hADMSC-kben és fehér zsírsejtekben, mely arra utal, hogy ezek a sejtek képesek lehetnek 5HT termelésre és kibocsájtásra. Ugyanakkor a clozapine kezelt és a “beige” adipocitákban a TPH1 expressziója szignifikánsan csökkent. A differenciálódó “browning” zsírsejtek a 2A, 1D és 7 típusú 5HT receptor géneket fejezték ki. Emellett a clozapine “browning” hatása csökkent exogén 5HT jelenlétében.

A 5HT receptorok közül a 2A típus fejeződött ki a legnagyobb mértékben hADMSC-kben és differenciált adipocitákban. A hosszútávú clozapine kezelés ugyanakkor a HTR2A gén le-regulálódását váltotta ki. Eredményeink azt sugallják, hogy a csökkent mértékű 5HT termelés és receptor-mediált jelátvitel hozzájárul a clozapine “browning”-ot kiváltó hatásához.

4.7. A “beige” koktél, az irisin és a BMP7 egy funkcionális “browning” programot indít be, míg a clozapine kezelt zsírsejtek kevésbé válaszolnak a termogenikus aktivációra

A következő lépésben, a fent említett módon differenciáltatott “browning” zsírsejtek funkcionális jellemzőit vizsgáltuk. Az irisin és a BMP7 kezelt fehér adipociták nagyobb mennyiségű mitokondriális DNS-t tartalmaztak; hasonlóképpen a “beige” irányba differenciált zsírsejtekhez. A clozapine kezelt adipociták a fehér zsírsejtektől több, de a “beige” adipocitákétól kevesebb mitokondriális DNS-t tartalmaztak.

A génexpressziós és morfológiai változásokkal összhangban az *ex vivo* differenciált “beige” adipociták bazális OCR-je magasabb volt, mint a fehér zsírsejteké. Az irisin és a clozapine kezelt fehér zsírsejtek esetében is emelkedett mitokondriális légzést tapasztaltunk. Ezután a sejtek egy löket sejt permeábilis dibutiril-cAMP kezelést kaptak, mely az adrenerg stimulációt képes modellezni. Azt tapasztaltuk, hogy az irisin és a BMP7 kezelt, valamint a “beige” koktéllal differenciáltatott zsírsejtek stimulált mitokondriális légzése magasabb volt, mint a fehér adipocitáké. Ugyanakkor a clozapine jelenlétében differenciáltatott zsírsejtek kevésbé tudták a légzésüket fokozni termogenikus aktiváció hatására.

Majd, az ATP-szintáz aktivitását gátoltuk oligomycinnel. Így az ún. proton csorgásos légzést tudtuk detektálni. Mind a bazális, mind a cAMP által stimulált OCR értékek magasabbak voltak a “beige” adipociták esetében, a fehér zsírsejtekhez viszonyítva. A clozapine jelenlétében differenciáltatott adipocitáknak ugyanakkor csak a bazális proton csorgásos légzése volt emelkedett.

Ezenfelül megvizsgáltuk a zsírsav béta-oxidáció és a kreatin szubsztrát ciklus részvételét az *ex vivo* differenciált zsírsejtek anyagcseréjében. Amikor a “beige” sejteket és a clozapine kezelt adipocitákat etomoxirral illetve β -GPA-val kezeltük, azt figyeltük meg, hogy nagyobb mértékben csökkent a bazális és cAMP stimulált mitokondriális légzésük, mint a fehér zsírsejteknek. Eredményeik azt mutatják, hogy a clozapine indukált “browning” sejtek, hasonlóképpen a “beige” adipocitákhoz több zsírsavat égetnek el β -oxidáció révén és tovább növelik energia-leadásukat a kreatin szubsztrát ciklus bekapcsolásával.

Vizsgáltuk az UCP1 és a PGC-1 α gének kifejeződésének változását, 4 órán át tartó dibutiril-cAMP kezelés hatására, mely szintén egy elfogadott kísérleti rendszer a termogenikus aktivációra adott válasz mérésére. Mindkét gén expressziója nagymértékben fokozódott cAMP jelenlétében clozapine kezelést nem kapott

zsírsejtekben. A termogenikus aktiváció hatása ugyanakkor kisebb volt a clozapine jelenlétében differenciált “browning” adipocitákban.

Összegezve elmondható, hogy az irisin, a BMP7 és a specifikus koktél átlát indukált “browning” együtt járt a fokozott mitokondriális biogenezissel és emelkedett energia felszabadulással, hőtermelő stimulusok hatására. Clozapine hatására ugyanakkor “masked”-jellegű “beige” adipociták differenciálódtak, melyek válaszadó képessége kisebb volt β -adrenerg termogenikus aktivációra.

4.8. A differenciálódó humán “browning” adipociták citokineket (“batokinek”) szekretálnak

Végül vizsgáltuk a barna és “beige” zsírsejt differenciáció hatását a citokinek szekréciójára *ex vivo* differenciáltatott humán fehér, barna és “beige” adipocitákban. A differenciáltatási médiumok cseréje során, az 1. és 2. hét után az adipociták kondicionált felülúszóit begyűjtöttük, majd pooloztuk és a tápfolyadékba szecernált IL-6, IL-8, TNF α , MCP-1 és IL1- β mennyiségének meghatározását ELISA módszerrel végeztük. Az IL-1 β és a TNF α nem volt detektálható mennyiségben az adipocita felülúszókban. A humán “beige” zsírsejtek differenciációs médiumában az IL-6, MCP-1 és IL-8 szekréció mértéke jelentősen magasabb volt a fehér adipocitákhoz képest. A fehér zsírsejt differenciáció során az irisin kezelés növelte az IL-6, MCP-1 és IL-8 termelést. A fehér és a “beige” zsírsejt differenciáció során alkalmazott BMP7 kezelés következtében ugyanakkor csökkent a vizsgált citokinek kibocsájtása.

A citokinek szekrécióját napról-napra is nyomon követtük, ezen kísérlet eredménye szerint az MCP-1 és a IL-8 termelés a differenciáció első hetének végén mutatta csúcsát az *ex vivo* “beige” adipogenikus differenciáció alatt, majd a szekréció lecsökkent. Az IL-6 szekréciója folyamatosan növekedett a “beige” zsírsejtek által, mégpedig olyan módon, hogy a sejtek naponta újratermelték a poolozott mintákban is megtalálható mennyiségű citokint. Ez arra utal, hogy az IL-6 szekréció a “beige” differenciáció alatt szigorúan szabályozott illetve, hogy a fejlődő “browning” zsírsejtek egy számukra megfelelő szintre állítják be az IL-6 mennyiségét a tápfolyadékban.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az *ex vivo* “browning” analízis metodológiai áttekintése – hogyan lehet a sejtpopulációk heterogenitását vizsgálni?

Annak ellenére, hogy barna zsírsejt differenciációs protokollt már régóta kidolgoztak humán sejteken is alkalmazva, csak korlátozott adat áll rendelkezésünkre a barna és a “beige” differenciációt irányító útvonalokról és szabályozó faktorokról embereken. Első célunk az volt, hogy a fent említett protokollt optimalizáljuk a hasfali szubkután eredetű hADMSC-k “browning” programjának kiváltására. A koktél meghatározó eleme - a hosszú távú rozigitazon kezelés - a “browning” kiváltására korábban nem csak sejt kultúrás kísérletekben, hanem rágsálókban is képes volt *in vivo*.

A zsírsejt populációk egy *ex vivo* differenciációs programot követően minden esetben heterogének maradtak, a differenciáció típusától függetlenül. Ezért célul tűztük ki, hogy a humán “browning” programot ne csak a sejtlizátumokból mért gén- és fehérje expressziós mérésekkel vizsgáljuk, hanem találjunk rá specifikusan a “browning” adipocitákra, azok morfológiai sajátosságai alapján. Korábban, egyes kutatók már sikeresen alkalmaztak áramlási citometriát, hogy meghatározzák a humán zsírsejtek felszíni markereinek kifejeződését vagy, hogy az úszó zsírsejteket elválasszák az SVF-ben található egyéb sejt típusoktól. Az áramlási citometria egyébként nagy hatékonysága ellenére sem dolgoztak ki még olyan protokollt, mellyel specifikusan lehetne elkülöníteni “browning” adipocitákat egy nagyméretű sejtpopulációban. Ennek egyik oka, hogy széles-körben elfogadott felszíni markerek a zsírsejt-típusok elválasztására nem állnak rendelkezésünkre. Emellett az úszó zsírsejtek precíz morfológiai tulajdonságai (pl. a lipidcseppek mérete és száma) a mérés körülményi miatt nehezen határozhatók meg. Ezenfelül a differenciációs program időbeli után követése is nehézkes lenne áramlási citometriával.

Másrészről az LSC – mely pásztázó lézereket, mikroszkópot és automatikus képelemzést felhasználva, kombinálja a mikroszkóp kép-előállítását és a citometria automatizálhatóságát előnyeit – lehetővé teszi nagyméretű sejtpopulációk vizsgálatát a sejtek morfológiájának károsítása nélkül. Emellett a LSC-vel nemcsak folyadékban szuszpendált, hanem a felszínhez tapadó sejtek vizsgálata is könnyedén lehetséges. Miután figyelembe vettük az áramlási citometria és a LSC használatának előnyeit és hátrányait, úgy döntöttünk, hogy egy széles körben alkalmazható technikát alakítunk ki a “browning” *ex vivo* kvantifikálására, a képalkotó citometriát alkalmazva.

5.2. A lézer-pásztázó citometriával (LSC) történő “texture” és Ucp1 tartalom meghatározás hatékonyan azonosítja a “browning” adipocitákat

A barna és “beige” zsírsejtek nagyszámú mitokondriumot és sok kis lipidcseppet tartalmaznak, multilokuláris elrendeződésben. A lipidcseppek mérete és száma közvetlenül kvantifikálható egy fluoreszcens jel szegmentálásával. Ennek hátránya, hogy a szegmentálás nagyban függ az algoritmus küszöb-szintjétől és jelentősen különbözhet mintáról-mintára, a festésekből adódó eltérések miatt. Doan-Xuan és mtsai. kimutatták, hogy a “texture” analízis legalább olyan szenzitív módszer az adipocita differenciáció alatti lipidcsepp változások után követésére, mint a fluoreszcens zsírfestés. A módszer egyszerűsége és a kis objektumok esetében a festés után felmerülő szegmentálási nehézségek elkerülése végett, a “texture” meghatározása mellett döntöttünk, mely egy megbízható módszernek bizonyult a lipidcseppek méretének vizsgálatára.

Kísérleteinkben nemcsak a “texture” paramétereket, hanem a meghatározó “browning” marker fehérje tartalmát is meghatároztuk az egyes differenciálódó adipocitákban. Ezt követően minden egyes sejt esetében ábrázoltuk a “texture sum variance” és az Ucp1 vagy Cidea immunofluoreszcens intenzitás értéket. A “browning” adipocitákat a kisméretű lipidcseppjeik és a magas Ucp1 vagy Cidea fehérje tartalmuk alapján azonosítottuk. Ezzel ellentétben, a fehér zsírsejtek nagy lipidcseppeket akkumuláltak és alacsony mértékben fejezték ki a “browning” marker fehérjéket.

A kombinált analízissel azt találtuk, hogy a humán hasfali szubkután zsírszövetből származó ADMSC-k képesek egy hatékony “beige” program beindítására *ex vivo*. Egyrészt, két hét differenciációt követően a sejtek felében jelentek meg lipidcseppek. Másrészt, a zsírsejtek 15-30%-a a “browning” adipocitákra jellemző morfológiai tulajdonságokkal bírt már a fehér adipogenikus koktél alkalmazását követően is. Nagy valószínűséggel már elköteleződött “beige” progenitor sejtek is jelen lehettek a szubkután zsírból izolált SVF-ekben. Ezek már nem voltak differenciálthatók fehér zsírsejtekké, még a fehér protokoll jelenlétében sem. Ezen felül a differenciált sejtek 30-70%-a vette fel a “browning”-ra jellemző morfológiát, amikor a “beige” koktél alkalmaztuk. Az Elabd és mtsai. által kifejlesztett protokollt eredetileg barna indukciós koktélnak írták le. Ezzel párhuzamosan a differenciációs protokoll alkalmazása a “browning” marker gének emelkedett kifejeződéséhez, nagyobb mennyiségű mitokondriális DNS-hez és megnövekedett oxigén fogyasztáshoz vezetett. Ugyanakkor azt találtuk, hogy ezek a változások inkább egy “beige”-szerű differenciáció következményei, hiszen a széles-körben “beige” sejtek azonosítására alkalmazott

marker gén, a TBX1 expressziója fokozódott, míg a “klasszikus barna”- szelektív ZIC1 gén kifejeződése nem változott.

A kevert adipocita populációkban bekövetkezett “browning” irányú eltolódást valószínűleg az váltotta ki, hogy a “beige” differenciációs koktél az SVF-ekben fellelhető bi- vagy multipotens mezenchimális prekursor sejtekben “browning” programot indukált. Az elhízást gátló illetve a zsírokat raktározó “beige” és fehér adipociták arányát nagyban meghatározza a korai mezenchimális előalakok elköteleződése *in vivo*. Ezekből az elkötelezett progenitorokból fejlődnek ki majd az érett adipociták. Mindezen adatok arra utalnak, hogy a “beige” adipociták valójában egy meghatározott előalak populációból differenciálódnak. Egy másik vizsgálatban kimutatták, hogy a “beige” prekursorok a növekvő kapilláris hálózatok mentén helyezkednek el és rapid proliferációval válaszolnak angiogenikus jelekre. Úgy gondoljuk, hogy ezek a prekursorok jelen vannak a humán szubkután zsírszövetben és differenciációs programjuk nyomon követhető LSC alkalmazásával.

Összességében bemutattuk, hogy az LSC – kiegészítve a “browning” markerek génexpressziós vizsgálatával – egy hatékony eszköz lehet a humán barna és “beige” zsírsejt differenciáció sejtpopulációs szintű analízisére. Ez a módszer segítheti a különböző endogén vagy exogén anyagok “browning”-ra kifejtett közvetlen hatásának mérését, akár humán minták alkalmazásával. Méréseink során így sikerült korábban, egerekben felismert “browning”-ot indukáló hormonok (irisin és BMP7) hatását megerősíteni, humán szubkután zsírsejteken. Ezzel a technikával bemutattuk, hogy a clozapine képes a zsírsejt differenciáció folyamatát “browning” irányába tolni. A jövőben a bemutatott módszer alkalmas lehet arra, hogy vizsgáljuk az egyes egyénekből származó hADMSC-k “browning”- irányú differenciációs potenciálját, illetve hogy homogén barna vagy “beige” sejtpopulációkat szortoljunk ki további vizsgálatok céljára. Ez nemcsak a barna és “beige” adipocita differenciáció további részleteinek megértését segítheti elő emberekben, hanem lehetőséget nyújthat transzplantálható termogenikus zsírszövet *in vitro* tervezésére. Hasonlóképpen Min és mtsai. humán “beige” zsírsejteket ültettek át egerekbe, melyekben ezáltal csökkent az elhízás és az inzulin rezisztencia kialakulásának valószínűsége.

5.3. A génexpressziós mintázat és a “batokin” szekréció megkülönbözteti az irisin és a BMP7 által indukált “browning” programot

A differenciálódó humán adipociták irisin, BMP7 és clozapine kezelése hasonló morfológiai változásokat eredményezett. Az ezzel párhuzamos génexpressziós és funkcionális eltérések azonban jelentősen eltértek a kezelés függvényében. A korábbi egérikísérletek eredményeinek megfelelően az irisin adagolás egy “beige” programot indukált humán adipocitákban is. Az irisinnel kezelt sejtek mitokondriális DNS tartalma és bazális oxigénfogyasztása is magasabb volt a fehér adipocitákhoz viszonyítva. Emellett nagymértékben reagáltak dibutiril-cAMP stimulációra. Továbbá, a fehér adipocita differenciáció során az irisin kezelés növelte az IL-6, MCP-1 és IL-8 termelést. Az Elabd és mtsai. által kifejlesztett protokoll szerint differenciáltatott “beige” sejtek is hasonlóképpen viselkedtek. Ezzel ellentétben, a fokozott „klasszikus” barna marker gén (ZIC1) expressziója mellett a C/EBP β , PRDM16 és a PPAR γ emelkedett kifejeződését figyeltük meg, hosszú távú BMP7 kezelés hatására, mely egy “klasszikus barna”-szerű programra utal. Az irisin hatásához hasonlóan, ez is együtt járt a megnövekedett mitokondriális DNS tartalommal és fokozott bazális illetve stimulált respirációval. A fehér és a „beige” zsírsajt differenciáció során alkalmazott BMP7 kezelés következtében ugyanakkor csökkent a vizsgált citokinek szekréciója.

Eredményeink arra utalnak, hogy a bőr alatti zsírszövetből származó zsírsajt előalakok képesek lehetnek különböző jelek hatására a fehér mellett egy „klasszikus barna”-szerű vagy egy „beige”- jellegű differenciációs program beindítására is, melyekben általánosan megfigyelhető a barna zsírszöveti funkciót meghatározó legfontosabb gének fokozott kifejeződése. Ezek a zsírsajt minden esetben képesek voltak termogénikus aktivációra funkcionális választ adni. Ugyanakkor a “klasszikus barna” és a “beige” adipocitáknak lehetnek a termogenezistől független, egyedi funkciói. Erre példa az IL-6, MCP-1 és IL-8 citokinek emelkedett szekréciója a “beige” differenciáció alatt. Megjegyzendő, hogy a gyulladásos mediátorok emelkedett szintje nemcsak a zsírszövet átalakulásához vezethet elhízás alatt, hanem elősegítheti a “browning” adipociták differenciációját és aktivációját bizonyos körülmények között.

5.4. Clozapine, egy váratlan, új “browning”-ot fokozó szer

A clozapine kezelés hatására a differenciálódó zsírsajt több, kisebb lipidcseppet és nagyobb mennyiségű mitokondriális DNS-t tartalmaztak. Ezzel párhuzamosan a clozapine kezelés szignifikánsan fel-regulálta az UCP1, ELOVL3, CIDEA, CYC1,

PGC-1 α és TBX1 géneket. De a ZIC1 gén expressziója nem változott, mely arra utal, hogy a clozapine a “beige”, nem pedig a “klasszikus barna” útvonalat indította be. A megfigyeléseinkkel összevág, hogy Sárvári és mtsai. emelkedett MCP-1 és IL-8 szekréciót találtak a clozapine kezelt fehér adipociták által. Ugyanakkor a clozapine-indukált “beige” sejtekben egy funkcionális deficitet azonosítottunk XF96 oximéterrel. A clozapine kezelt adipociták bazális mitokondriális légzése (úgy mint a bazális proton csorgásos respiráció) ugyan emelkedettnek bizonyult a fehér zsírsejtekhez viszonyítva, de az így kifejlődött “masked beige” adipociták képtelenek voltak hatékonyan válaszolni a sejt permeábilis cAMP agonista által képzett jelre. Emellett génexpressziós vizsgálataink is azt sugallják, hogy a clozapine jelenlétben differenciált zsírsejtek kevésbé voltak képesek cAMP stimulusra aktiválódni. Korábbi tanulmányok – melyek megváltozott cAMP jelátvitelt találtak AAP-kal kezelt patkányok és emberek KIR-ében – alátámasztják mérési eredményeinket. Ugyanakkor, a clozapine adagolás fokozta a zsírsejtek energia leadását a közelmúltban leírt – “beige” sejtekre jellemző – kreatin szubsztrát ciklus beindításával. A kreatin útvonal jelentőségét a “beige” adipociták funkciójában már kimutatták egerekben és humán sejtvonalakon. Ugyanakkor, tudomásunk szerint, a dolgozatban bemutatott mérések az elsők, melyek bizonyítják az útvonal meglétét és fontosságát primer humán zsírsejtekben.

Az elhízás és a következményes kórállapotok előfordulása duplája a szkizofréniában és egyéb súlyos mentális betegségekben szenvedőkben az átlagpopulációhoz képest. A clozapine az adipociták “browning”-ját váltotta ki *ex vivo*, annak ellenére, hogy ismert obezitást kiváltó hatása *in vivo*. Hasonló jelenséget figyeltek meg bizonyos tiazolidéndionok adagolásakor is. Különböző centrális és perifériás mechanizmusokat vetettek fel az AAP- indukált elhízás molekuláris hátterének magyarázataként. Például Kim és mtsai. kimutatták az AAP-k étvágyfokozó hatását, a hipotalamikus AMP-kináz, H1 receptorok általi aktivációján keresztül.

Végezetül, célul tűztük ki a clozapine “browning” hatása mögött álló molekuláris mechanizmus megismerését. A clozapine ismert farmakológiai - 5HT receptorokat gátló - hatását figyelembe véve, vizsgáltuk a “browning” létrejöttét 5HT jelenlétében. Ez idáig, 14 különböző 5HT-receptor (HTR1-7) típust írtak le, melyek jelentős hányada kifejeződik fehér vagy barna zsírszövetben, rágsálókban. Azt is kimutatták, hogy a 3T3-L1 egér adipociták képesek 5HT kibocsátására. Humán zsírsejtekben a HTR1D, 2A, 3A és 7 receptor gének kifejeződését írtak le különböző vizsgálatok. Azt találtuk, hogy az adipocita előalakok és fehér zsírsejtek egyforma mértékben kifejezték a TPH1

enzimet – mely az 5HT szintézis sebesség-meghatározó lépését katalizálja a KIR-en kívül – kódoló gént, mely arra utal, hogy e sejtek képesek lehetnek a 5HT előállítására az adipogenikus differenciáció alatt. A TPH1 expressziója ugyanakkor csökkent a “beige” és a clozapine kezelt zsírsejtekben. Ezenfelül, kimutattuk, hogy a humán primer adipociták a 2A, 1D és 7 típusú 5HT-receptorokat fejezték ki. Emellett a clozapine-indukált “beige” génexpressziós válasz szignifikánsan csökkent exogén 5HT jelenlétében. A közelmúltban két csoport függetlenül bizonyította, hogy a perifériás 5HT csökkenti a “beige” potenciált és a “browning” zsírsejtek hőtermelő képességét egerekben. Más vizsgálatok kimutatták, hogy az emelkedett perifériás 5HT szint és egyes TPH1 gén polimorfizmusok elhízásra hajlamosítanak. Mintáinkban a HTR2A gén fejeződött ki a legnagyobb mértékben a 5HT receptorok közül. Ehhez a receptorhoz képes a clozapine a legnagyobb affinitással kötődni. A HTR2A Gq jelátvitelt indít be, melyről bebizonyosodott, hogy fékezte a “browning” folyamatát egerekben és humán adipocitákban. Összességében a bemutatott eredmények és irodalmi adatok arra utalnak, hogy a clozapine, legalább részben, az 5HT-receptor mediált jelátvitel gátlásán keresztül indukálja a “browning” folyamatát.

Azt találtuk, hogy a clozapine kezelés – valószínűleg a 5HT jelátvitel gátlásával - befolyásolta a humán zsírsejt előalakok differenciációját. Ez “beige” sejtek kifejlődéséhez vezetett, melyek azonban csökkent válaszképességgel bírtak akut termogenikus aktivációra. Ez a tulajdonságuk lehet az egyik oka annak, hogy a “beige” sejtek a clozapine kezelt betegekben miért nem szabadítanak fel nagymennyiségű energiát *in vivo*. Ugyanakkor, a clozapine jelenlétében kifejlődött “masked beige” sejtek egyéb farmakológiai módszerrel történő aktiválása lehetőséget adhat az AAP-indukált súlygyarapodás megelőzésében és kezelésében. Eredményeink remélhetőleg, új tanulmányok indítását ösztönzik a jövőben, melyek segítségével e sejtek azonosíthatóak és a KIR-től független módon aktiválhatóak lesznek az AAP-kezelt betegekben.

6. TÁRGYSZAVAK

adipocita, beige, browning, clozapine, irisin, lézer-pásztázó citometria, elhízás, szerotonin, termogenezis, UCP1

7. ÖSSZEFOGLALÁS

- Statisztikailag releváns számú, differenciálódott humán adipocita vizsgálatát a Lézer Pásztázó Citométer (LSC) alkalmazásával értük el. Az LSC használata lehetővé tette számukra az adherens adipociták multiparametrikus vizsgálatát: a sejtek festése nélkül kvantifikáltuk az adipocitákban lévő lipid cseppek számát és méretét (ún. texture analízissel), majd a sejtek fixálását és permeabilizálását követően jelöltük az Ucp1 és Cidea barna zsírsejt marker fehérjéket, specifikus antitestekkel.
- Megfigyeltük, hogy mind az irisin, mind a BMP7 alkalmazása a fehér differenciációs protokoll alatt fokozta az UCP1 és CIDEA mellett az ELOVL3, CYC1 és PGC-1 α általános barna zsírsejt marker gének kifejeződését. A ZIC1 („klasszikus barna” marker) emelkedett kifejeződését figyeltük meg, hosszú távú BMP7 kezelés hatására. A TBX1 „beige” marker gén kifejeződését ugyanakkor csak az irisin kezelés fokozta.
- A második generációs antipszichotikumok alkalmazása gyakran vezet elhízáshoz. Humán szövetből izolált preadipociták clozapine kezelése ennek ellenére a barna és “beige” marker gének legtöbbjének, illetve az Ucp1 fehérje kifejeződését szignifikánsan fokozta, míg a fehér és általános zsírszöveti marker gének kifejeződése a kezelés hatására nem változott. Eredményeink arra utalnak, hogy clozapine kezelés képes “beige” zsírsejt differenciáció iniciálására humán *ex vivo* rendszerben, azonban az így létrejött sejtek reakciója természetes hőképző stimulusokra csökkent.
- Vizsgáltuk, hogy a clozapine kezelés “beige” programot kiváltó hatása összefügg-e a szer ismert, szerotonin (5HT) receptorokat gátló farmakológiai hatásával. A differenciálódó zsírsejtek kifejezték a 2A, 1D és 7-típusú 5HT receptorokat. A barna marker gének fokozott kifejeződése clozapine hatására, szerotonin jelenlétében nem volt megfigyelhető. Eredményeink arra utalnak, hogy a clozapine “browning”-ot kiváltó hatása összefügg a szer 5HT receptorok által kiváltott jelátvitel-gátló képességével.
- Végül megfigyeltük, hogy az *ex vivo* differenciáltatott barna zsírsejtek és irisin kezelt fehér zsírsejtek nagymértékben termelnek IL-6, IL-8 és MCP-1 citokineket. Ismert, hogy egerekben az IL-6 termelés kedvezően befolyásolhatja az inzulin szenzitivitást, míg a fokozott IL-8 és MCP-1 elősegítheti makrofágok odavándorlását a differenciálódó barna sejtek környezetébe. A makrofágok esetleges alternatív úton történő aktiválódása noradrenalin termelést válthat ki, mely fokozhatja a barna adipociták hő termelő képességét is.

8. PUBLIKÁCIÓK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/283/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kristóf Endre

Neptun kód: N64U4X

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

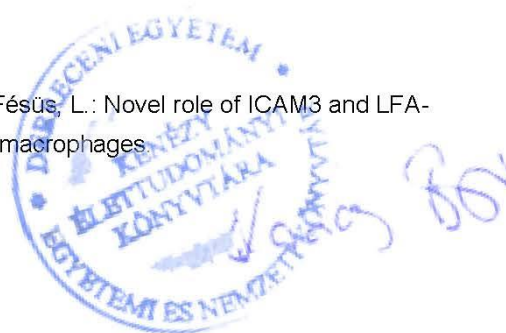
1. **Kristóf, E.**, Doan-Xuan, Q. M., Sárvári, A. K., Klusóczy, Á., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Bacsó, Z., Bai, P., Balajthy, Z., Fésüs, L.: Clozapine modifies the differentiation program of human adipocytes inducing browning.
Transl. Psychiatry. "Accepted by Publisher", 2016.
IF: 5.538 (2015)
2. **Kristóf, E.**, Doan-Xuan, Q. M., Bai, P., Bacsó, Z., Fésüs, L.: Laser-scanning cytometry can quantify human adipocyte browning and proves effectiveness of irisin.
Sci. Rep. 5, 1-9, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep12540>
IF: 5.228





További közlemények

3. Abdul-Rahman, O., **Kristóf, E.**, Doan-Xuan, Q. M., Vida, A., Nagy, L., Horváth, A., Simon, J., Maros, T. M., Szentkirályi, I., Palotás, L., Debreceni, T., Csizmadia, P., Szerafin, T., Fodor, T., Szántó, M., Tóth, A., Kiss, B. K., Bacsó, Z., Bai, P.: AMP-Activated Kinase (AMPK) Activation by AICAR in Human White Adipocytes Derived from Pericardial White Adipose Tissue Stem Cells Induces a Partial Beige-Like Phenotype.
PLoS One. 11 (6), e0157644, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0157644>
IF: 3.057 (2015)
4. Szatmári-Tóth, M., **Kristóf, E.**, Veréb, Z., Akhtar, S., Facskó, A., Fésüs, L., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., Petrovski, G.: Clearance of autophagy-associated dying retinal pigment epithelial cells - a possible source for inflammation in age-related macular degeneration.
Cell Death Dis. 7 (9), e2367, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.133>
IF: 5.378 (2015)
5. Csomós, K., **Kristóf, E.**, Jakob, B., Csomós, I., Kovács, G., Rotem, O., Hodrea, J., Bagoly, Z., Muszbek, L., Csősz, É., Fésüs, L.: Protein cross-linking by chlorinated polyamines and transglutamylation stabilizes neutrophil extracellular traps.
Cell Death Dis. 7 (8), e2332, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.200>
IF: 5.378 (2015)
6. Albert, R.*, **Kristóf, E.***, Zahuczky, G., Szatmári-Tóth, M., Veréb, Z., Oláh, B., Moe, M. C., Facskó, A., Fésüs, L., Petrovski, G.: Triamcinolone regulated apopto-phagocytic gene expression patterns in the clearance of dying retinal pigment epithelial cells. A key role of Mertk in the enhanced phagocytosis.
Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj. 1850 (2), 435-446, 2015.
*These authors contributed equally in this work.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.026>
IF: 5.083
7. **Kristóf, E.**, Zahuczky, G., Katona, K., Doró, Z., Nagy, É., Fésüs, L.: Novel role of ICAM3 and LFA-1 in the clearance of apoptotic neutrophils by human macrophages.
Apoptosis. 18 (10), 1235-1251, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-013-0873-z>
IF: 3.614





8. Zahuczky, G., **Kristóf, E.**, Majai, G., Fésüs, L.: Differentiation and Glucocorticoid Regulated Apopto-Phagocytic Gene Expression Patterns in Human Macrophages: role of Mertk in Enhanced Phagocytosis.
PLoS One. 6 (6), e21349, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021349>
IF: 4.092

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,368

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,766

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.10.26.



9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban a témavezetőmnek, Dr. Fésüs László Professzor Úrnak szeretném kifejezni őszinte hálámat a Ph.D. tanulmányaim alatt nyújtott folyamatos támogatásért, motivációért, valamint az értékes szakmai megbeszélésekért. Köszönettel tartozom a lehetőségért, hogy a munkacsoportjában tanulhattam és dolgozhattam.

Köszönetem szeretném kifejezni a Sejtbiokémia Kutatócsoport és az MTA-DE Össejt, Apoptózis és Genomika Munkacsoport minden jelenlegi és múltbéli tagjának a barátságos munkahelyi légkörért. Különösen hálás vagyok Dr. Demény Máténak, hogy konstruktív tanácsaival, szakmai és baráti beszélgetésekkel folyamatosan segített engem.

Köszönet illeti Nagy Jennifer, Klem Attiláné és Szalóki Szilvia asszisztensi tevékenységét, melyek nagyban segítettek kísérletes munkámat.

Hálás vagyok kollaborációs partnereinknek: Dr. Bacsó Zsoltnak, Dr. Quang-Minh Doan-Xuan-nak és Dr. Bai Péternek, segítségükért a lézer-pásztázó képalkotásban és elemzésben illetve a sejtes respirációs mérésekben, valamint hasznos tanácsaikért.

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Balajthy Zoltánnak és Dr. Sárvári Anitta Kingának a humán zsírsejtes vizsgálatok elindításában tett erőfeszítéseikért a munkacsoportunkban.

Hálás vagyok Dr. Zahuczky Gábornak, aki rengeteg segítséget nyújtott számomra TDK munkám során. Ugyancsak köszönöm Dr. Petrovski Goran-nak és munkatársainak (Dr. Albert Réka, Szatmári-Tóth Mária, Dr. Veréb Zoltán) a közös munkát, támogatást.

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Győry Ferencnek és az Augusztia Sebészeti Központ munkatársainak, hogy zsírszövet mintákat biztosítottak kísérleteinkhez.

Köszönet illeti a társ-témavezetésemmel tevékenykedő hallgatók (Klusóczki Ágnes, Veress Roland, Combi Zsolt és Varga Klára) munkáját is.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tőzsér Józsefnek, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet jelenlegi vezetőjének a lehetőségért, hogy ebben az Intézetben dolgozhatok.

Végezetül, minden egyes munkatársamnak szeretném hálámat kifejezni a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben.

A legnagyobb köszönettel és hálával, szeretett családomnak és drága barátaimnak tartozom, akik folyamatosan bátorítottak és segítettek tanulmányaim és munkám során.